

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ПРОБИОТИКОВ

УДК 636.579.64:612.3

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ
И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАКТОАМИЛОВОРИНА
В ЖИВОТНОВОДСТВЕ**

Б.В. Тараканов

Институт физиологии, биохимии и питания с.-х. животных РАСХН, Боровск, Россия

Исследования последних лет свидетельствуют о все возрастающем интересе ученых и практиков к использованию микроорганизмов в сельскохозяйственном производстве. Они применяются в животноводстве в качестве как кормовых средств, так и биологических регуляторов метаболических процессов в организме животных и птицы (Тараканов, 1987, 1988). Особое значение биологические препараты приобретают в связи с усиливающейся техногенной и антропогенной нагрузкой на организм животных, особенно в условиях промышленного содержания. Обычно это проявляется в нарушении процессов саморегуляции у основных представителей кишечного биоценоза, в усилении изменчивости бактерий и вирусов, быстром развитии множественной лекарственной устойчивости и увеличении патогенности таких условно-патогенных микроорганизмов, как бактерии группы кишечной палочки, энтерококки, протей, клебсиеллы, стафилококки. При этом среди причин отхода молодняка основное место занимают болезни, связанные с нарушениями деятельности желудочно-кишечного тракта, возбудителями которых является условно-патогенная микрофлора. В сложившейся ситуации возникла необходимость разработки нового поколения экологически безопасных препаратов или пробиотиков, использование которых в значительной степени будет способствовать обеспечению биологической защиты и высокой продуктивности животных.

Микрофлора пищеварительного тракта и здоровье животных. В природных условиях установление микрофлоры в пищеварительном тракте теплокровных животных вскоре после рождения является неизбежным процессом. Однако, несмотря на чрезвычайно важную роль микрофлоры в жизнедеятельности макроорганизма, до настоящего времени нет единой ее классификации. Одни исследователи, используя в качестве основополагающих критериев количественные аспекты микрофлоры, подразделяют ее на главную, сопутствующую и остаточную (Пинегин и др., 1977). Принимая всю микрофлору, населяющую желудочно-кишечный тракт, за 100 %, к главной (в основном бифидобактерии и бактероиды) относят около 90 %, к сопутствующей (лактобактерии, эшерихии, энтерококки и др.) - 10 %, к остаточной (клебсиеллы, цитробактерии, протей, дрожжи, клостридии, стафилококки, аэробные бациллы и др.) - не более 1 %.

Другие авторы (Блохина, Дорофейчук, 1979) разделяют микроорганизмы, с которыми взаимодействует макроорганизм в процессе его жизнедеятельности, на четыре группы:

- микроорганизмы, появление которых в отдельных полостях носит случайный характер, так как они не способны к длительному пребыванию в таких условиях;
- бактерии, входящие в состав облигатных представителей нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и выполняющие важную роль в активации метаболических процессов организма-хозяина и защиты его от инфекции;
- микроорганизмы, достаточно часто встречающиеся у здоровых людей и животных, - в основном условно-патогенные бактерии, которые считаются пред-

ставителями нормальной микрофлоры. Однако при снижении резистентности макроорганизма и радикальных изменениях количественного и качественного состава микрофлоры именно эти бактерии выполняют чрезвычайную роль, они выступают в качестве отягощающего звена при отдельных заболеваниях или как этиологический фактор, приводящий к возникновению болезней с разной степенью тяжести;

- возбудители инфекционных болезней, которые встречаются в латентном или активном состоянии. В условиях резкого снижения количества облигатных видов микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте они значительно активируют свои патогенные свойства, при этом основная роль в возникновении таких условий отводится применению антибиотиков и воздействию стресс-факторов (Тимошко, 1990).

Микрофлору здоровых людей и животных называют аутомикрофлорой, нормальной микрофлорой, либо просто микрофлорой. Однако это далеко не одно и то же. О. В. Чахава (1984) предложил называть аутомикрофлорой микробную флору любого состава, имеющуюся у данного хозяина в конкретной ситуации, а нормальной - микрофлору, характерную для здоровых представителей данной популяции. Таким образом, аутомикрофлорой является любая микрофлора – дисбактериозная, нормальная и др.

В эволюции взаимоотношений микроба и хозяина в большинстве случаев естественный отбор сохраняет особи, достигшие динамического равновесия. Результат такого отбора - сформированная в филогенезе индигенная, или аутохтонная, часть нормальной микрофлоры, являющаяся открытым биоценозом, в составе которого кроме индигенных всегда находятся случайные и условно-патогенные виды, но в безопасных для здорового хозяина количествах.

По мнению экологов и микробиологов, микробные популяции подчиняются общим экологическим закономерностям (Clarke, 1977). Симбиоз между бактериями различных видов (например, в кишечнике) имеет многообразные формы: нейтрализм, конкуренция, аменсализм, паразитизм, компенсализм, мутуализм и др. Однако вопреки такому размаху вариабельности взаимоотношений, микрофлора быстро превращается в очень стабильную популяцию, которая помогает животному сохранять устойчивость к желудочно-кишечным инфекциям. Этот феномен, описанный различными авторами, получил название «бактериальный антагонизм», «бактериальное вмешательство», «барьерный эффект», «колонизационная резистентность», «конкурентное исключение» (Fuller, 1989).

Мнение о полезном эффекте пробиотиков базируется на следующих фактах:

- безмикробные животные более чувствительны к заболеваниям, чем их близнецы с полной кишечной флорой. Например, безмикробные морские свинки могут быть убиты 10 клетками *Salmonella enteritidis*, тогда как для свинки с нормальной микрофлорой необходимо 10^9 клеток;

- введение антибиотиков животным уменьшает их резистентность к болезням (у мышей при сальмонеллезной, шигелловой и вибриозной инфекциях; у птицы повышенная выживаемость сальмонелл в кишечнике часто связана с включением в рационы антибактериальных ростовых стимуляторов);

- устойчивость к заболеванию можно повысить введением суспензий из фекалий; так, носительство сальмонелл в кишечнике устраняли дачей суточным цыплятам суспензии из фекалий взрослой птицы (Fuller, 1989).

Таким образом, нормальная кишечная микрофлора животных предохраняет их от заболеваний. Потребность в применении пробиотиков возникает при несоблюдении условий выращивания молодняка: ограниченном контакте с матерями, нарушениях в кормлении и содержании. При этом в микрофлоре кишечника развивается дефицит облигатных бактерий.

Механизм действия пробиотиков. Анализ имеющихся литературных данных свидетельствует о многогранном воздействии пробиотиков на микроэкологию

пищеварительного тракта. Наиболее важными аспектами взаимодействия пробиотических штаммов с микрофлорой кишечника и организмом животного являются образование антибактериальных веществ, конкуренция за питательные вещества и места адгезии, изменение микробного метаболизма (увеличение или уменьшение ферментативной активности), стимуляция иммунной системы, противораковое и антихолестеринемическое действие.

Молочнокислые бактерии продуцируют множество антагонистических факторов, которые включают метаболические конечные продукты, антибиотикоподобные вещества и бактериоцины.

Лактобациллы образуют значительное количество уксусной, муравьиной, молочной кислот и перекиси водорода, ингибирующие свойства которых хорошо известны. В процессе метаболизма многие из них закисляют pH ростовой среды до 4,5 и ниже. Сами они толерантны к низкому pH, но его снижение до значения 4,5 оказалось строго бактерицидным для ряда штаммов *Micrococcus* sp. и *B. cereus*. Вместе с тем, лактобациллы в результате образования метаболитов уменьшают окислительно-восстановительный потенциал, что способствует более полному ингибирующему действию на облигатно- и факультативно-аэробные бактерии.

Следует, однако, отметить, что некоторые авторы (Интизаров, 1986) метаболитный механизм антагонистического действия органических кислот считают эффективным только для условий *in vitro* и скептически относятся к нему при оценке воздействия лактобацилл и бифидобактерий на условно-патогенные и патогенные бактерии в экосистеме кишечника. Подобное мнение объясняется тем, что pH в кишечнике не опускается ниже 6,5. Однако это противоречит установленным фактам. Так, у лошадей состав кишечного химуса зависит от состава рациона, а его pH после голодания составляет 4,67-6,32, до работы 5,0-6,57 и после работы 4,8-5,56. У свиней pH химуса двенадцатиперстной кишки варьирует в пределах от 3,5 до 7,0, но большую часть времени находится на уровне 4-5. У птицы минимальный pH составляет в зобе – 4,1, железистом желудке – 0,3, мышечном желудке – 0,4, двенадцатиперстной кишке – 5,6, первой и второй частях тонкой кишки соответственно 6,0 и 5,7, слепой и прямой кишках – 5,6 и 5,3. Исходя из этого, нет оснований однозначно отрицать антагонистическое действие образуемых в пищеварительном тракте органических кислот против находящихся там патогенов.

Кишечные лактобациллы оказывают антагонистическое действие также путем продукции антибиотических субстанций и бактериоцинов.

Представители рода *Lactobacillus* spp., и в частности *Lactobacillus acidophilus*, обладают выраженными ингибирующими свойствами против кишечных патогенов, и это специфическое действие обусловлено продукцией таких антибиотиков, как ацидофилин, лактолин и ацидолин. Ацидолин вместе с молочной кислотой обеспечивает высокую антимикробную активность против энтеропатогенных видов *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staph. aureus*, *Clostridium perfringens* и ряда других спорообразователей.

В пищеварительном тракте человека, свиней, птицы обитает *Lactobacillus reuteri*. Сравнительно недавно установили, что покоящиеся клетки этой гетероферментативной бактерии превращают глицерин в сильную антимикробную субстанцию, получившую название рейтерин - низкомолекулярное, нейтральное, небелковое водорастворимое соединение. Первоначальное изучение спектра его антагонистической активности показало, что он подавлял рост бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus* и в меньшей степени ингибировал представителей родов *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus* (Axelsson et al., 1989). В дальнейшем выявили, что он эффективен против родов эукариот, дрожжей, грибов родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Saccharomycoides*, *Aspergillus*, *Fusarium* и паразитических простейших вида *Trypanosoma cruzi*. Вместе с тем, эти же авторы установили, что рейтерин ингибировал репликацию B2 и лямбда фагов соответственно в *L. plantarum* и *E.*

coli. Таким образом, рейтерин является антимикробным, антидрожжевым, антигрибным, антипротозойным и антивирусным агентом.

Установили, что *L. reuteri* может обеспечивать регулирование микрофлоры кишечника и защиту животного от потенциальных патогенов. Высокоактивный штамм *L. reuteri* 1063 синтезирует рейтерин в условиях, существующих в пищеварительной системе, проявляет высокую поверхностную гидрофобность и адгезию к эпителиальным клеткам кишечника свиней, и, наконец, рейтерин-продуцирующие штаммы могут быть выделены в относительно больших количествах из желудка, двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок, а также из фекалий здоровых поросят.

Другой класс антагонистических соединений, продуцируемых лактобациллами, – бактериоцины – белковые комплексы с бактерицидной активностью, обычно проявляющейся в пределах семейства *Lactobacillaceae* против видов близкородственных продуцентов бактерий. Их продукция обнаружена у различных видов лактобацилл. Бактериоцины, продуцируемые *Lactobacillus fermenti* (Klerk et al., 1967), проявляли бактерицидную активность против штаммов *L. fermenti* и *L. acidophilus*, не инактивировались в широком диапазоне pH или каталазой, не проходили через диализные мембраны и осаждались в присутствии ацетата аммония. Бактериоцин, продуцируемый *L. fermenti* 466, оказался чувствительным к трипсину и пепсину, но резистентным к обработке теплом (96 °C - 30 мин), мочевиной или лизоцимом (Klerk et al., 1967).

Несколько бактериоцинов обнаружено у *L. acidophilus*. Barefoot, Klaenhammer (1983) описали два бактериоцина: лактацин В и лактацин F. Первый из них ингибировал бактерии видов *L. leuchmanii*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* и *L. lactis*, а второй, в дополнение к указанным, подавлял *L. fermentum* и *Streptococcus faecalis*. Бактерицидное действие лактацина В возрастало пропорционально его концентрации. Очищенный препарат — белок с молекулярной массой 6000-6500 Да имел такой же спектр антагонистической активности, что и «сырой» препарат. Лактацин F представляет собой пептид, состоящий примерно из 56 аминокислот (Mariana, Klaenhammer, 1991).

У *L. plantarum* выявили бактериоцины плантарицин А – бактерицидный против грамположительных бактерий (*L. plantarum*, *L. pentosaceus* и *L. paramesenteroides*), устойчивый к нагреванию (100°C - 30 мин) и активный в интервале pH от 4 до 6,5 (Daeshel, 1986) и плантарицин SIK, который ингибировал бактерии родов *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Streptococcus*. Скорость гибели клеток линейно зависела от концентрации плантарицина, а бактерицидное действие инициировалось его связыванием. Плантарицин нарушал проницаемость мембран и приводил к потере низкомолекулярных соединений клетками и их лизису. Из штамма *L. plantarum* LL 441 с широким спектром антагонистического действия выделили плантарицин С, представляющий собой пептид с молекулярной массой около 3500 Да (Ganzaes et al., 1994). Он проявлял бактерицидное и в некоторых случаях бактериолитическое действие на чувствительные культуры, его активность сохранялась после кипячения и обработки при различных значениях pH.

Продукция бактериоцинов продемонстрирована также у *L. helveticus*. Они названы лактоцин 27 и гелветицин J. (Upreti, Hindsdill, 1975). Бактериоцины, продуцируемые *L. brevis* В 37 и *L. casei* В 80, получили названия соответственно бревацин 37 и ка-зеицин 80. Первый из них проявлял антагонистическую активность в отношении многих молочнокислых бактерий и *Nocardia corallina*, тогда как второй ингибировал лишь один штамм *L. casei* В 109 (Rammelsberg, Raider, 1990).

Необходимо отметить, что кроме лактобацилл бактериоцины образуют грамотрицательные кишечные бактерии, энтерококки, стрептококки и многие другие систематические группы микроорганизмов. Среди бактерий рубца бактериоциногенно обнаружили у *Streptococcus bovis* (Iverson, Millis, 1976) и анаэробов рода *Butyrivibrio* (Kalmokoff, Teather, 1997). Последние оказались чувствительными к

бактериоцинам лактобацилл, которые, следовательно, не только защищают животных от потенциальных патогенов, но и воздействуют на структуру микробной популяции и метаболизм в рубце. Таким образом, бактериоциногенная в экосистеме пищеварительного тракта животных и птицы является важной проблемой, требующей пристального внимания исследователей.

Несмотря на то, что кишечник является богатым источником нутриентов, исключить дефицит отдельных из них невозможно. Различия в метаболической активности отдельных видов микроорганизмов позволяют некоторым из них расходовать необходимые питательные вещества из ростовой среды и, таким образом, ингибировать рост других бактерий. В этом отношении очень эффективна *L. acidophilus*. Показано также, что пищевая конкуренция является фактором, ограничивающим рост *Clostridium difficile* в кишечнике.

Другой механизм предотвращения колонизации кишечника патогенами – конкуренция за места адгезии на поверхности кишечного эпителия. Микроорганизмы, обладающие адгезивными свойствами, характеризуются наличием хемотаксиса в отношении слизистой оболочки кишечника, что в значительной степени ускоряет образование ассоциативной связи между эпителиальными клетками организма хозяина и микробами. С учетом этого принципа микроорганизмы, ассоциированные со слизистой оболочкой, составляют мукозную микрофлору (М-флору), а локализующиеся в просвете – полостную (П-микрофлору) (Тимошко, 1990).

Состав П- и М-микрофлоры пищеварительного тракта может существенно различаться по количественной и качественной характеристикам и он по-разному изменяется в зависимости от рациона кормления и внешних воздействий (Пинегин, 1984; Selwood, 1984). При этом в проксимальном отделе желудочно-кишечного тракта М-микрофлора представлена преимущественно грамположительными микроорганизмами, а в дистальном отделе – грамотрицательными и грамположительными. Весьма важно, что М-микрофлора повышает колонизационную резистентность кишечника, оказывая защитный эффект чисто механически – препятствуя пенетрации слизистой оболочки патогенными и условно-патогенными микробами и конкурируя с ними за взаимодействие с рецепторами эпителиальных клеток слизистой кишечника. Доказано также, что М-микрофлора способствует нормальному течению метаболических процессов в эукариотических клетках, а эпителиальные клетки используют большинство продуктов конститутивного метаболизма бактерий. С этих позиций в микроэкологии пищеварительного тракта чрезвычайно важны сроки заселения его отдельными микроорганизмами. В частности, если сразу после рождения в данную полость первыми проникают условно-патогенные и патогенные бактерии с высокой адгезивностью, то в течение нескольких часов они занимают все свободные экониши и образуют М-микрофлору. При этом облигатные виды нормальной микрофлоры даже при обильном поступлении в пищеварительный тракт составляют лишь П-микрофлору. Такие животные в 100 % случаев заболевают (Тимошко, 1990).

Исходя из этого очевидно, что дача животным в течение первого часа после рождения пробиотического штамма, способного оккупировать эпителиоциты, обеспечит их защиту от адгезии потенциальных патогенов. Исследования с *E. coli* показали, что принцип является правильным. Если поросят обрабатывали непатогенным штаммом *E. coli* K 88, а затем давали патогенный штамм *E. coli* K 88, то они были более резистентны к инфекции, чем контрольные животные. Адгезия *E. coli* на уроэпителиальных клетках может быть предотвращена предобработкой последних фрагментами клеточных стенок или целыми клетками лактобацилл.

При выборе штаммов для приготовления пробиотиков следует, однако, помнить, что адгезия является специфичным для хозяина феноменом, она варьиру-

ет между штаммами одного вида и может быть изменена условиями роста и используемыми средами (Fuller, 1989).

При исследовании воздействия пробиотиков на микробный метаболизм установили, что после скармливания человеку *L. acidophilus* в кишечнике подавлялась активность Р-глюкуронидазы, нитроредуктазы и азоредуктазы. При даче крысам того же штамма ацидофильной палочки наблюдали снижение активности Р-глюкуронидазы и 3-глюкозидазы. Имеются также данные, что пробиотики могут проявлять свое влияние путем увеличения активности полезных ферментов и, в частности, Р-галактозидазы, которая облегчает лактозную нетолерантность у человека.

Известно, что конвенциональные животные с полной кишечной флорой имеют высокую фагоцитарную активность и повышенные уровни иммуноглобулинов в сравнении с безмикробными животными. Штамм *Enterococcus faecium* (вид, часто используемый в пробиотических препаратах), установленный как моноассоциат у безмикробной мыши, был способен снижать количество *S. typhimurium* в селезенке, что указывает на его системное действие. При скармливании безмикробным мышам йогурта в их крови увеличивался уровень антител, а лактобациллы вовлекались в стимуляцию фагоцитарной активности. При этом особенно активной была культура *L. casei* при пероральном введении. Лактобациллы способны мигрировать из кишечника в системную циркуляцию и могут много дней выживать в селезенке, печени и легких. *L. casei* и *L. plantarum*, вводимые парентерально, стимулировали фагоцитарную активность, а при даче *L. plantarum* также увеличивалась природная киллерная клеточная активность (Bloksma et al., 1981).

На модели безмикробных крыс получены интересные данные о воздействии кишечной палочки М-17 и бифидобактерий на местную иммунную систему кишечника. При морфометрическом исследовании слизистой оболочки тонкой кишки выявили, что наиболее значительную активацию факторов местной неиммунологической и иммунологической защиты вызывала *E. coli* М-17 в моно- и диассоциации с *B. bifidum*. У крыс, которым вводили эшерихии, в слизистой оболочке тонкой кишки значительно повышалась плотность клеточного инфильтрата, в нем увеличивалось количество бластных форм лимфоцитов, незрелых и зрелых плазмоцитов, а также макрофагов. Таким образом, введение *E. coli* М-17 влияло на факторы местной иммунной защиты, о чем свидетельствовало также увеличение в собственной пластинке глобулин-продуцирующих и макрофагальных клеток (Грачева и др., 1986). Аналогичный местный иммунный ответ наблюдался после диассоциации крыс эшерихиями и бифидобактериями, тогда как одни бифидобактерии оказывали менее выраженное влияние на факторы местной иммунной защиты.

Не меньший интерес представляют данные о том, что иммуномодулирующий эффект оказывают не только живые эшерихии и бифидобактерии. Так, в опытах Н. Н. Мальцевой и соав. (1982) на мышах было показано, что ежедневная дача в течение 10 сут убитых нагреванием (56 °С – 2 ч) штаммов *Bifidobacterium adolescentis* Им-1, *L. acidophilus* А4 и *Streptococcus faecalis* Н-22 приводила к увеличению содержания иммуноглобулинсинтезирующих клеток в lamina propria тонкой кишки животных и повышала их выживаемость при экспериментальной сальмонеллезной инфекции. Введение мышам препарата убитых бактериоидов штамма *B. fragilis* 1/1080 г подобным эффектом не сопровождалось. Исходя из этих данных, целесообразна разработка новых иммуностимуляторов на основе убитых нагреванием бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков для использования в ветеринарии. Такой подход может быть перспективным. Так, при одновременном применении для профилактики дисбактериозов различной этиологии с клиникой диарейного синдрома иммунокорригирующей (цитокины) и пробиотической терапии отход поросят снижался почти в 3 раза (Панин и др., 1996).

О противоопухолевой активности *L. bulgaricus* впервые сообщили Bogdanov et al. (1962). В дальнейшем появилось более десятка работ, в которых обсуждалась

антиопухолевая активность различных видов лактобацилл. Полученные данные свидетельствовали, что они оказывали ингибирующее действие на опухолевые клетки, подавляли бактерии, которые продуцируют β -глюкуронидазы, азоредуктазы и нитроредуктазы, конвертирующие в пищеварительном тракте проканцерогены в канцерогены, разрушали канцерогены типа нитрозаминов и подавляли активность нитроредуктазы, которая вовлекается в их синтез.

Механизм продукции молочнокислыми бактериями противоопухолевой активности неясен. В одном из сообщений предполагалось, что антиопухолевая активность обусловлена гликопептидами (Bogdanov et al., 1975). Варьирующие результаты относительно противоопухолевой активности молочнокислых бактерий, особенно *L. bulgaricus*, могут быть частично объяснены лабильностью активного начала.

В ряде исследований показано, что кишечная микрофлора может изменять уровень холестерина в сыворотке крови. У безмикробных животных, содержащихся на обогащенных холестерином рационах, аккумулируется приблизительно в 2 раза больше холестерина в крови, чем у животных с обычной микрофлорой. Последние экскретируют холестерина в фекалиях больше, чем безмикробные животные, и это дает основание полагать, что кишечная микрофлора препятствует его всасыванию из кишечника (Пинегин др., 1984).

Исследования с чистыми культурами лактобацилл, бифидобактерий, молочнокислых стрептококков и эшерихий показали, что они способны ассимилировать холестерин. Так, установили, что *L. acidophilus* в присутствии желчи и в анаэробных условиях активно удаляла холестерин из лабораторных сред (Gilliland et al., 1985). В результате скрининга штаммов *L. acidophilus* на способность потреблять холестерин были отобраны штаммы RP32 и P47, ассимилирующие соответственно значительное и незначительное количество холестерина в лабораторных тестах, которые были использованы в опытах по кормлению животных.

В этих опытах свиньи, содержащиеся в индивидуальных клетках, в недельном уравнительном периоде получали рацион с добавкой холестерина, который скармливали дважды в день в дозе 1000 мг на одно кормление. Дополнительно каждой свинье первой группы (контроль) давали 50 мл молока в день, животным второй группы скармливали 50 мл молока, содержащего 5×10^{10} клеток штамма *L. acidophilus* P47, а третьей - 50 мл молока с 5×10^{10} клеток *L. acidophilus* RP32 в день. Результаты показали, что штамм RP32, ассимилирующий значительное количество холестерина в опытах *in vitro*, достоверно снижал его содержание в сыворотке крови у свиней третьей группы, в сравнении с контролем и второй группой, то есть он оказался перспективным для приготовления пробиотика, обладающего антихолестеринемическим действием.

Другой активностью, проявляемой *L. acidophilus*, которая может оказывать существенное влияние на уровень холестерина в крови, является способность к деконъюгации желчных кислот. Различные виды лактобацилл, обитающих в пищеварительном тракте, деконъюгируют таурохолиевую и гликохолиевую кислоты. Такая деконъюгационная активность обычно проявляется у организмов в анаэробных условиях и она становится важной по отношению к уровню холестерина в сыворотке крови, так как деконъюгированные желчные кислоты обеспечивают меньшее всасывание липидов из кишечного тракта, чем конъюгированные. Это может приводить к уменьшению всасывания холестерина из кишечника и, таким образом, влиять на его содержание в крови (Gilliland, 1990).

Представленные выше данные однозначно свидетельствуют, что пробиотики оказывают многообразное действие как на микрофлору желудочно-кишечного тракта, так и на обменные функции организма животных, а пробиотический эффект различных бактерий определяется суммой специфических активностей, которыми эти организмы обладают. Молочнокислые бактерии, например, оказывают полезное действие посредством образуемых антибиотиков, продукции органических ки-

слот и изменения величины рН, образования перекиси водорода, снижения окислительно-восстановительного потенциала среды, конкуренции за места адгезии и питательные вещества. Бактерии других систематических групп и, в частности рубцовые виды, могут продуцировать биологически активные вещества, необходимые для роста других бактерий, утилизировать вредные продукты обмена и, таким образом, поддерживать экологическое равновесие в пищеварительном тракте. Поэтому наиболее перспективными, хотя и технологически более сложными, могут быть пробиотические препараты, которые состоят из бактерий различных видов (микробный консорциум), находящихся в синтрофных взаимоотношениях. При этом, однако, не исключается использование отдельных видов бактерий, обладающих необходимыми свойствами или улучшенных генно-инженерными методами.

При отборе культур для приготовления пробиотиков следует помнить, что они должны удовлетворять определенным требованиям:

- являться нормальными обитателями желудочно-кишечного тракта здоровых животных, быть непатогенными и нетоксичными, поскольку использование других бактерий может привести к непредвиденным эффектам;

- быть метаболически активными в экосистеме рубца (в случае приготовления пробиотика для жвачных), переносить пассаж через желудок и метаболизировать в кишечнике моногастричных животных и птицы, увеличивая их рост или резистентность к заболеваниям;

- обладать способностью к адгезии на эпителии и приживлению в пищеварительном тракте, где ферментативная активность, связанная с перевариванием корма высокая, а среда агрессивная;

- быть стабильными и способными длительное время оставаться жизнеспособными при хранении в производственных условиях.

Новый пробиотик лактоамиловорин. Этот пробиотик разработан во ВНИИФБиП с.-х. животных. Для его приготовления предложен новый антагонистический штамм *Lactobacillus amylovorus* БТ-24/88 (ВКПМ, В-6253) [II]. Отличительными особенностями штамма являются следующие: способность к ферментации крахмала, которой другие лактобациллы, используемые для приготовления пробиотиков, не обладают; устойчивость к хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, канамицину, рифампицину и полимиксину, а также к 1 %-ной концентрации байтрила (энрофлоксацина), 0,5%-ному энромагу, эфлоксатрилу (концентрация до 10%), 1 %-ному диоксидину, дитриму; продукция антибиотических веществ широкого спектра действия; высокая толерантность к неблагоприятным факторам кишечника (желчи, этанолу, фенолу); отсутствие патогенности, токсичности и токсигенности.

Применение лактоамиловорина при выращивании поросят, телят и цыплят-бройлеров стабильно обеспечивает ингибирование в кишечнике эшерихий, сальмонелл и гемолитических бактерий; стимулирование микроорганизмов, гидролизующих сложные полисахариды; увеличение потребления концентрированных кормов; повышение ферментативной активности в тонком кишечнике; стимуляцию неспецифической резистентности животных; профилактическое и лечебное действие при желудочно-кишечных болезнях, протекающих с клинической картиной диареи; увеличение сохранности животных и прироста массы тела; выраженное антихолестеринемическое действие.

Производственная проверка эффективности применения лактоамиловорина при выращивании телят проводилась в 1997 (n=263) и 1998 г (n=1546) в хозяйствах Калужской, Кировской и Нижегородской областей.

Результаты испытаний, выполненных в 1997 г., показали, что препарат не оказывал отрицательного влияния на состояние здоровья животных, повышал их резистентность к желудочно-кишечным расстройствам на 37-51 %, а при их возникновении продолжительность болезни уменьшалась на 1,7 дня. Сохранность телят возрастала при даче лактоамиловорина до 93-100 % (против 75-88 % в контро-

ле), прирост массы тела – на 8,2-11,7 %, а затраты обменной энергии и переваримого протеина на 1 кг прироста снижались соответственно на 8,4 и 4,9 %. При этом окупаемость затрат возрастала почти в 2 раза, при уменьшении расходов на лечение одного животного.

В АО «Родина» Боровского района Калужской области дача пробиотика телятам до месячного возраста не оказала неблагоприятного влияния на состояние здоровья животных и существенно повышала их резистентность к желудочно-кишечным болезням. Так, в контрольной группе из 20 заболели 15, или 75 % телят, в опытной – только у 27 из 105 животных появлялись клинические признаки диареи и профилактический эффект лактоамиловорина составил 74,3%. При этом контрольный молодняк заболевал, как правило, на 3-и сутки после рождения, тогда как подопытный в среднем на 6-е сутки, продолжительность болезни составляла соответственно 7 и 3,6 сут. Подопытные телята переболевали значительно легче и болезнь у многих из них завершалась выздоровлением без дополнительного медикаментозного лечения. Среднесуточный прирост массы тела у телят опытной группы при прочих равных условиях составил 746 г против 653 г в контроле или превосходил последний на 14,2 %.

Испытание лактоамиловорина в других колхозах и акционерных предприятиях Боровского района Калужской области показало, что его профилактический эффект в разных хозяйствах заметно варьировал. Так, в АО «Борисово» количество телят с признаками диареи снизилось с 44,9 (1997 г.) до 31,7 % (1998 г.), в СКХ «Русь» этот показатель составил соответственно 65,5 и 62,7 %, в колхозах «Москва» и им. Циолковского появление у молодняка желудочно-кишечных расстройств несколько возрастало. Тем не менее, в среднем по этим хозяйствам падеж животных, вызванный диареей, снизился с 41 (в 1997 г.) до 18 голов (в 1998 г.), или на 56,1 %, а сохранность увеличилась соответственно с 96,7 до 98,5 %.

В опытах, проведенных на Кировской лугоболотной опытной станции, установили, что развитие диареи у телят в первые 5 дней после рождения снижалось с 90 % в контроле до 87 % в опытной группе, тогда как повторно желудочно-кишечные расстройства регистрировали соответственно у 63,3 и 34,3 % телят с 6-дневного возраста и старше, т. е. лактоамиловорин значительно повышал устойчивость животных к повторному заболеванию. При этом сохранность молодняка к месячному возрасту составляла соответственно 83,3 и 87,1 % в контрольной и опытной группах, а среднесуточный прирост массы тела у получавших пробиотик животных увеличивался на 16,5 %.

Освоение НПК «БИО БЭК» производства лактоамиловорина дало новый стимул его производственным испытаниям, которые были проведены в 2003-2004 гг. В испытаниях приняли участие СПК «Октябрьский», СПК «Беляево», ЗАО «ПЗ им. Цветкова» Калужской области, ЗАО «Старая Ситня» и ЗАО «Каширокое» Московской области, ЗАО «Мокрое» Липецкой области, «АФ Элита» Челябинской области, ОАО «Маяк» Воронежской области, колхоз «Соловьевский» Нижегородской области, ПЗ им. Ленина Тамбовской области и ряд хозяйств Алтайского края.

Положительные результаты получены повсеместно. Они проявились в повышении сохранности молодняка и увеличении прироста живой массы, уменьшении продолжительности болезни и снижении расходов на медикаменты.

В целом, широкие производственные испытания лактоамиловорина свидетельствуют, что его применение при выращивании телят на 37-74% повышает их резистентность к желудочно-кишечным расстройствам, а при возникновении диареи на 1,7-3,4 суток уменьшает продолжительность заболевания, увеличивает прирост живой массы на 10-22% и окупаемость затрат почти вдвое. Сохранность телят повышается до 90-100%, расходы на лекарственные препараты снижаются на 25-80%, а иногда их совсем не требуется.

Производственную проверку эффективности применения лактоамиловорина при выращивании поросят осуществляли на свиномкомплексе агрофирмы «Крив-

ское» Калужской области. В опытные и контрольные группы отбирали по 30 свиноматок с поросятами, которых содержали в типовом помещении, отвечающем зоогигиеническим требованиям, предъявляемым к промышленным комплексам. Размещение животных проводили по принципу "все свободно – все занято", отнимали поросят от маток в 45-дневном возрасте.

В период с 14- до 60-дневного возраста животным скармливали молоко, обрат, комбикорм, травяные гранулы и мясо-костную муку. Поросята контрольных групп дополнительно к подкормке получали кормовой антибиотик биовит-80, а молодняк опытных групп – лактоамиловорин в первые пять суток после рождения с сосков свиноматок, которые смазывали один раз в день пастообразным препаратом в дозе 15-20 г. С 15-дневного возраста жидкий препарат ежедневно вводили в молоко или обрат групповым методом из расчета 3-4 мл на одно животное до 60-дневного возраста.

В период 1-го турового опороса при использовании лактоамиловорина поносы наблюдали у 20 % поросят и они практически отсутствовали в предотъемный и послеотъемный периоды. Животные этой группы были клинически здоровыми, активными и хорошо поедали подкормку. В контрольной группе, получавшей биовит-80, диарею разной степени тяжести регистрировали у 80% животных, они были менее активными, хуже использовали подкормку и отставали в росте. Дача пробиотика увеличивала среднесуточный прирост на 32,5 %, массу 1 головы в 2-месячном возрасте – в среднем на 3,86 кг.

Результаты 2-го турового опороса, проведенного в весенне-летний период, показали, что при даче пробиотика расстройства пищеварения легкой и средней степени тяжести наблюдали у 30 % поросят в основном в первую половину подсосного периода, но они отсутствовали в предотъемный и послеотъемный периоды. В контрольной группе при даче биовита-80 диареей переболело 60 % животных, а поносы регистрировали как перед отъемом, так и после него. В результате этого поросята хуже использовали корм и среднесуточный прирост массы тела у них был ниже на 22,2 %. В 2-месячном возрасте масса тела подопытных поросят была на 2,38 кг выше, чем у контрольных сверстников.

В исследованиях, выполненных Литвинец (2001) в ЗАО «Дороничи» Кировской области, было показано, что включение лактоамиловорина в рацион хряков-производителей увеличивает объем эякулята на 21-39,8%, концентрацию спермы – на 12,3% и ее выход – на 6-12,5 дозы, а оплодотворяемость свиноматок этой спермой - до 83-90 против 77% в контроле. Экономическая эффективность применения лактоамиловорина в рационах хряков-производителей достигает 4814-5151 руб. на условную голову.

Введение лактоамиловорина в рацион холостых свиноматок в течение 10 дней до- и после осеменения увеличивает выход живых поросят на 10,8% и массу гнезда – на 8,9%. Условная молочность свиноматок возрастает на 37,2%, а средняя живая масса 21-дневных поросят – на 17,4%. Сохранность молодняка достигает 97%, а экономическая эффективность – 279 руб. на одно гнездо.

Включение лактоамиловорина в рационы супоросных свиноматок в течение 10 дней до- и после опороса уменьшает выход слабых поросят на 20-23%. Введение пробиотика подсосным поросётам с 5-7-го дня до отъема 10-дневными циклами увеличивает массу гнезда на 40-42%, повышает сохранность до 98%, а экономическую эффективность – до 918 руб. на одно гнездо.

Под воздействием разных доз лактоамиловорина (0,1-0,25 г/гол.) заболеваемость поросят диареями снижается в 3-7 раз, средняя продолжительность болезни уменьшается на 11-19%, а сохранность поросят возрастает до 98-100%. Введение пробиотика в рацион ремонтного молодняка увеличивает среднесуточный прирост на 45%, а живую массу в 6-месячном возрасте – на 33%, что на 19 кг больше, чему сверстников контрольной группы.

Испытания лактоамиловорина, изготовленного НПК «БИО БЭК» промышленным способом, подтвердили его эффективность.

Так, в ЗАО «Каширское» Каширского района Московской области при скормливании лактоамиловорина заболеваемость поросят диареями снижалась в 3-7 раз, а время болезни уменьшалось на 11-19%, сохранность повышалась до 98%. В ООО «Возрождение» Тульской области, свиномкомплексе «Вишневский» Воронежской области, племзаводе им. Ленина Тамбовской области, ООО «Вольшское» Липецкой области, СПК «Восток» Алтайского края, принявших участие в производственных испытаниях лактоамиловорина, ветеринарно-зоотехнические параметры выращивания молодняка несколько варьировали. Заболеваемость поросят уменьшилась в 3-7 раз, сохранность возросла на 10-13,5% и достигала 95-100%, продолжительность болезни снижалась с 5-7 дней до 1-2, а приросты живой массы повышались на 17,5-30%. Таким образом, производственная апробация подтвердила репутацию лактоамиловорина как высокоэффективного пробиотика при выращивании поросят.

Оценку эффективности применения лактоамиловорина при выращивании цыплят-бройлеров проводили в цехе В-9 АОЗТ «Элинар» Наро-Фоминского района Московской области на двух группах цыплят-бройлеров кросса «Смена-2» с посадочным поголовьем в контрольной и опытной группах соответственно 11011 и 12130 голов. Бройлеров выращивали с суточного до 49-дневного возраста при полном содержании в рекомендуемых специалистами ГППЗ «Смена» параметрах плотности посадки, фронта кормления и поения, температурном и световом режимах, при постоянном доступе к корму и воде, а также при проведении плановых ветеринарных мероприятий.

Испытания показали, что включение пробиотика в комбикорма оказало регулирующее влияние на микрофлору зоба и слепых отростков цыплят. Количество лактобацилл в химусе этих отделов пищеварительного тракта возрастало, а численность гемолитических бактерий в зобе и слепых отростках уменьшалась соответственно в 7,7,4 и 7,2-9,4 раза ($P < 0,05$). При этом в зобе у цыплят обеих групп число амилотических бактерий было практически одинаковым, тогда как количество лактатферментирующих бактерий возрастало на 21,7-54,8%.

Применение препарата оказало благоприятное влияние на сохранность и рост птицы. Так, в контроле ее сохранность к 49-дневному возрасту составила 88,9 %, в опытной группе - 90 %. При этом бройлеры опытной группы в расчете на 1 голову съедали на 120 г или на 3,25 %, больше корма, а их масса тела превосходила таковую в контроле на 7,8 %. Следует однако отметить, что повышение прироста массы тела происходило не только за счет увеличения поедаемости корма, но и за счет улучшения эффективности его использования, о чем свидетельствовало снижение в опытной группе затрат корма на 1 кг прироста массы тела на 5,4 %.

Включение в комбикорма лактоамиловорина улучшало качество получаемой продукции. В контрольной группе 89 тушек из 100 отвечали требованиям I и II категорий, а в опытной группе - 92. В среднем по группам выход тушек I категории возрастал с 66,9 % в контроле до 69,5 % в опыте, а нестандартная продукция составила соответственно 10,7 и 8 %. Химический состав мяса существенно не изменялся.

В производственных испытаниях лактоамиловорина промышленной выработки, проведенных во ВНИТИП и птицефабриках ОАО «Бройлер Рязани», ООО «Гардарика», ОАО «Птицефабрика центральная» (г. Владимир), «Ржевская», было установлено, что применение пробиотика при выращивании цыплят-бройлеров увеличивает сохранность птицы на 1,1-2,5%, повышает прирост живой массы на 2,8-11,4% и снижает затраты корма на 1 кг прироста на 2,6-9,8%.

Испытание лактоамиловорина в гусеводстве показало, что его включение в течение месяца в рацион птицы увеличивало сохранность гусят на 2,6%, выход перепухового сырья на 7%, а в 6-месячном возрасте живая масса гусей, получавших

пробиотик, превосходила таковую в контроле на 12,5%. В мясе снижалось содержание влаги, жира и холестерина (на 33%), увеличивался уровень протеина и белково-качественный показатель, что делает мясо особенно ценным для диетического питания.

В целом проведенные эксперименты и практика использования лактоамиловорина в различных регионах России свидетельствуют о его высокой лечебно-профилактической и зоотехнической эффективности в скотоводстве, свиноводстве и птицеводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блохина И.Н., Дорофейчук В.Г. Дисбактериозы. М., 1979.
2. Грачева Н.М., Чахава О.В., Поспелова В.В., Гаврилов А.Ф., Рахимова Н.Г., Ханина Г.И., Щербakov И.Т., Новикова А.В., Аваков А.А., Дашевский Ю.Я. Теорет. и практические проблемы гнотобиологии (под ред. В.П. Шишкова и Ю.Ф. Исакова). М.: Агропромиздат, 1986: 212-217.
3. Интизаров М.М. Теорет. и практические проблемы гнотобиологии (под ред. В.П. Шишкова и Ю.Ф. Исакова). М.: Агропромиздат, 1986: 19-29.
4. Литвинец С.Г. Эффективность применения пробиотика лактоамиловорина в рационах свиней в условиях интенсивной технологии производства. Автореф. дисс... к.с.-х.н. Вят. гос. с.-х. акад. Киров, 2001, 23с.
5. Мальцева Н.Н. и др. Антибиотики и химиотерапия. 1982, 37 (12): 41-43.
6. Панин А.Н., Серых Н.И., Малик Е.В., Гараев И.М., Боровиков Н.В., Денисов А.А. Ветеринария, 1996, 3: 17-22.
7. Пинегин Б.В., Клемпарская Н.Н., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. ЖМЭИ, 1977, 7: 88-94.
8. Пинегин Б.В., Мальцев В.П., Коршунов В.М. Дисбактериоз кишечника. М., 1984, 143 с.
9. Тараканов Б.В. Использование микробных препаратов и продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. М.: ВНИИТЭИ агропром., 1987, 48с.
10. Тараканов Б.В. Использование пробиотиков в животноводстве. Калуга, 1998, 53с.
11. Тараканов Б.В. Патент РФ 2054478, опубл. 20.02.96. Бюл. №5.
12. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка с.-х. животных. Кишнев: Штиинца, 1990, 188 с.
13. Чахава О.В. Вестник с.-х. науки, 1984, 8: 116-123.
14. Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J., Lindgren S.E. Microb. Ecol. Health and Disease. 1989, 2 (2): 131-136.
15. Barefoot S.F., Klaenhammer T.R. Appl. Environ. Microbiol., 1983, 45: 1808-1815.
16. Bloksma N., Ettekoven H., Hothius F.M., van Noorbe-Jansen L., De Reuver M.J., Kreeftenberg J.G., Willers J.M. Med. Microbiol. Immunol., 1981, 170: 45-53.
17. Bogdanov I.G., Popkhirstov P., Marinov L. Abstr. VII Intern. Cancer Congress. 1962: 364.
18. Bogdanov I.G., Dalev P.O., Gurevich A.I., Kolosov M.N., Mal'kova V.P., Plemyannikova L.A., Sorokima I.B. FEBS Lett. 1975, 57: 259-261.
19. Clarke R.J.T. Microbial ecology of the gut (R.J.T. Clarke, T. Bauchop, eds.), London etc. 1977: 251-275.
20. Daeshel M.A., Mc Kenney M.C., Mc Donald L.C. ASM Bacteriol. Proc. 1986, 277
21. De Klerk H.C., Coetzee J.N. Nature (London), 1967, 214: 609.
22. Fuller R. J. Appl. Bacteriol., 1989, 66(5).
23. Gilliland S.E., Nelson C.R., Maxwell C. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49: 377-381.
24. Gilliland S.E. FEMS Microbiol. Rev., 1990, 87: 175-188.
25. Gonzales Beatriz, Arca Pilar, Mayo Baltsaz, Suárez Juan E. Appl. and Environ. Microbiol., 1994, 60(6): 2158-2163.
26. Iverson W.G., Millis N.F. Can. J. Microbiol., 1976, 22, 7: 1040-1047.
27. Kalmokoff M.L., Teather R.M. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63(2): 394-402.
28. Muriana P.M., Klaenhammer T.R. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57(1): 114-121.
29. Rammelsberg M., Raider F. J. Appl. Bacteriol., 1990, 69(2): 177-184.
30. Selwood R. Veter. Microbiol., 1984, 9(5): 477-486.
31. Upreti G.C., Hindsdill R.D. Antimicrobial. Agents Chemother. 1975, 7: 139-145.

Biological bases of probioticotherapeutics and efficiency of Lactoamilovarin use in animal production

B.V. Tarakanov

*Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Farm Animals,
Russian Agricultural Academy*

The role of gastrointestinal micro flora in maintaining the productivity, immune status and body resistance in ruminants and monogastric animals is discussed and modern concepts about mechanisms of biological action of probiotics are reviewed. Intestinal lactobacilli occur antagonistic action on the other microorganisms by means of secretion of antibiotic substances and bacteriocines. Relatively recently *Lactobacillus reuteri* has been found to transform glycerol to potent antimicrobial substance – reuterin which inhibits replication of B2 and λ - phages in *L. plantarum* and *E. coli* respectively. Reuterin-producing strains can be isolated in relatively large quantity from the stomach, duodenum, jejunum, ileum and from the excrements of healthy pigs. Another class of antagonistic substances producing by lactobacilli – bacteriocines. Production of bacteriocines was demonstrated in *L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. brevis* B37, *L. casei* B80. The most effective probiotics are the complex preparations consisting of various bacterial species with syntrophic relationships. The new probiotic Lactoamilovarin obtained on the base of new antagonistic strain *L. amylovorus* BT-24/88 produce a broad spectrum of antibiotic substances and has a capacity to fermentation of starch. In series of trials performed on new born calves Lactoamilovarin increased body resistance by 37-74%, daily live weight gain by 10-22%, veterinary medical expenses were shortened by 25-80%. In experiments performed on growing pigs Lactoamylovarin increased live weight gain by 45% and live weight at 6 months by 33%, i.e. by 19 kg compared to control. The experiments performed on broiler chicks also substantiated the efficiency of Lactoamilovarin in respect to safe keeping, growth promoting action and feed/gain ratio.

Key words: probiotics, lactobacillus, bacteriocines, new born calves, pigs, broiler chicks

Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 1: 89-101